

JP 99/5303

28.09.99

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

REC'D 08 OCT 1999

WIPO PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application:

1998年10月 2日

EUK

出 願 番 号

Application Number:

平成10年特許願第281124号

出 願 人

Applicant (s):

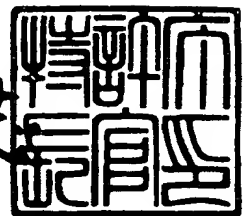
住友化学工業株式会社

PRIORITY
DOCUMENTSUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年 7月29日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

山 佐 健 志



出証番号 出証特平11-3053395

【書類名】 特許願

【整理番号】 P149669

【提出日】 平成10年10月 2日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 15/09

【発明の名称】 植物プロモーターおよびターミネーター

【請求項の数】 15

【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県宝塚市高司4丁目2番1号 住友化学工業株式会社
社内

【氏名】 西川 聡美

【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県宝塚市高司4丁目2番1号 住友化学工業株式会社
社内

【氏名】 大江田 憲治

【特許出願人】

【識別番号】 000002093

【氏名又は名称】 住友化学工業株式会社

【代表者】 香西 昭夫

【代理人】

【識別番号】 100093285

【弁理士】

【氏名又は名称】 久保山 隆

【電話番号】 06-220-3404

【選任した代理人】

【識別番号】 100094477

【弁理士】

【氏名又は名称】 神野 直美

【電話番号】 06-220-3404

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 010238

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9701007

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 植物プロモーターおよびターミネーター

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下の (a) または (b) の DNA を含む植物プロモーター。

(a) 配列番号 1 で示される塩基配列からなる DNA

(b) 配列番号 1 で示される塩基配列において 1 もしくは複数の塩基が欠失、置換もしくは付加された塩基配列からなり、かつ、植物細胞においてプロモーター機能を有する DNA

【請求項 2】

以下の (a) または (b) の DNA を含む植物ターミネーター。

(a) 配列番号 2 で示される塩基配列からなる DNA

(b) 配列番号 2 で示される塩基配列において 1 もしくは複数の塩基が欠失、置換もしくは付加された塩基配列からなり、かつ、植物細胞においてターミネーター機能を有する DNA

【請求項 3】

請求項 1 記載のプロモーター、所望の遺伝子および植物ターミネーターが機能可能な形で連結されてなるキメラ遺伝子。

【請求項 4】

請求項 1 記載のプロモーター、所望の遺伝子および請求項 2 記載のターミネーターが機能可能な形で連結されてなるキメラ遺伝子。

【請求項 5】

請求項 1 記載のプロモーターを有するベクター。

【請求項 6】

プロモーターの下流に遺伝子挿入部位および植物ターミネーターを有する請求項 5 記載のベクター。

【請求項 7】

請求項 1 記載のプロモーターの下流に遺伝子挿入部位および請求項 2 記載のターミネーターを有するベクター。

【請求項 8】

請求項 3 または 4 記載のキメラ遺伝子を有するベクター。

【請求項 9】

請求項 1 記載のプロモーターが宿主細胞に導入されてなる形質転換体。

【請求項 10】

請求項 3 または 4 記載のキメラ遺伝子が宿主細胞に導入されてなる形質転換体

【請求項 11】

請求項 5～8 記載のベクターが宿主細胞に導入されてなる形質転換体。

【請求項 12】

宿主細胞が微生物細胞である請求項 9～11 記載の形質転換体。

【請求項 13】

宿主細胞が植物細胞である請求項 9～11 記載の形質転換体。

【請求項 14】

形質転換植物の製造過程において、請求項 1 記載の植物プロモーターを植物の細胞に導入し該プロモーターの制御下に遺伝子を発現させる工程を含むことを特徴とする形質転換植物の製造方法。

【請求項 15】

形質転換植物の製造過程において、請求項 2 記載の植物ターミネーターを植物の細胞に導入し該ターミネーターの制御下に遺伝子を発現させる工程を含むことを特徴とする形質転換植物の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、植物プロモーターおよび植物ターミネーターに関する。

【0002】

【従来の技術】

植物へ遺伝子を導入し発現させることによって、有用形質を付与した種々の形質転換植物の作出が試みられ、一部で実用化されるに至っている。このような形

質転換植物を作出するには、植物の細胞内に導入した遺伝子を効率よく発現させることが重要である。プロモーターは遺伝子の転写レベルを決定する主要な因子であり、一般に目的遺伝子を転写活性の強いプロモーターの制御下におくことにより該遺伝子の発現量を高めることができる。また、ターミネーターは転写終結を指令する役割に加えて、転写により生じたRNA鎖のプロセッシングや分解に対しても重大な影響を示すことから、目的遺伝子の翻訳領域の3'末端直後にターミネーターを挿入しておくこと該遺伝子の発現量増大に効果的である。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】

しかしながら、このような遺伝子導入による植物育種に使用し得る植物プロモーターおよびターミネーターの作出は未だ十分とはいえず、遺伝子を植物で効率よく発現させることの可能な新たなプロモーターおよびターミネーターの開発が強く望まれている。

【0004】

【課題を解決するための手段】

このような状況下、本発明者らは植物の細胞内で機能可能なプロモーターおよびターミネーターについて鋭意検討を行った結果、特定の塩基配列を有するDNAを使用することにより、植物の葉、根などの組織において目的遺伝子を効率よく発現させることができることを見出し、本発明に至った。

すなわち、本発明は、

(a) または (b) のDNAを含む植物プロモーター（以下、本発明プロモーターと記す。）；

(a) 配列番号1で示される塩基配列からなるDNA

(b) 配列番号1で示される塩基配列において1もしくは複数の塩基が欠失、置換もしくは付加された塩基配列からなり、かつ、植物細胞においてプロモーター機能を有するDNA、

該プロモーター、所望の遺伝子および植物ターミネーターが機能可能な形で連結されてなるキメラ遺伝子、

該プロモーターを有するベクター、

該プロモーターが宿主細胞に導入されてなる形質転換体、および形質転換植物の製造過程において、該プロモーターを植物細胞に導入し該プロモーターの制御下に遺伝子を発現させる工程を含むことを特徴とする形質転換植物の作製方法、ならびに

(c) または (d) の DNA を含む植物ターミネーター（以下、本発明ターミネーターと記す。）；

(c) 配列番号 2 で示される塩基配列からなる DNA

(d) 配列番号 2 で示される塩基配列において 1 もしくは複数の塩基が欠失、置換もしくは付加された塩基配列からなり、かつ、植物細胞においてターミネーター機能を有する DNA を提供するものである。

【0005】

【発明の実施の形態】

以下、さらに詳細に本発明を説明する。

本発明で用いられる遺伝子工学的技術は、たとえば、J., Sambrook, E., F., Fritsch, T., Maniatis 著、モレキュラークローニング第 2 版 (Molecular Cloning 2nd edition)、コールド スプリング ハーバー ラボラトリー発行 (Cold Spring Harbor Laboratory press)、1989 年及び D., M., Glover 著、DNA クローニング (DNA Cloning)、IRL 発行、1985 年などに記載されている通常の方法に準じて行うことができる。

【0006】

本発明において、「プロモーター機能」とは、プロモーターとして作用する能力、すなわち、遺伝子の転写を開始する作用を意味し、「植物プロモーター」とは、植物においてプロモーター機能を有する DNA をいう。

本発明プロモーターは、具体的には、以下の (a) または (b) の DNA（以下、本プロモーター DNA と記す。）を含む。

(a) 配列番号 1 で示される塩基配列からなる DNA

(b) 配列番号 1 で示される塩基配列において 1 もしくは複数の塩基が欠失、置換もしくは付加された塩基配列からなり、かつ、植物細胞においてプロモーター機能を有する DNA

ここで、上記の塩基の欠失、置換もしくは付加には、DNAの取得源に用いられた生物の種差、個体差、組織間の差異等により天然に生じる変異や、DNAに人為的に導入された変異等が含まれる。本プロモーターDNAには、例えば、配列番号1で示される塩基配列において、植物細胞におけるプロモーター機能を有するかぎりその一部の塩基が欠失された塩基配列からなるDNAも含まれる。かかるDNAは、自然界からクローニングされたDNAであっても、自然界からクローニングされたDNAに塩基の欠失、置換または付加が人為的に導入されたDNAであっても、人為的に化学合成されたDNAであってもよい。

【0007】

本プロモーターDNAは、例えば、*Daucus carota*などのニンジンのゲノムDNA等からPCR法を利用して単離することができる。

具体的には、*Daucus carota*等のニンジンの葉などの組織を採取し、得られた組織を液体窒素中で凍結させた後、乳鉢などにより物理的に磨砕することにより細かい粉末状の組織片とする。該組織片から通常の方法によりゲノムDNAを抽出する。該抽出操作は、例えば、M.Shure et al, Cell, 35:225(1983)等に記載されているCTAB法、S.O.Rogers and A.J.Bendich, Plant.Mol.Biol., 5:69(1985)等に記載されている尿素-フェノール法などにより行なうことができる。得られたゲノムDNAを鋳型として、例えば、配列番号1の塩基番号1から20で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドと、配列番号1の塩基番号2029から2052で示される塩基配列に相補的な塩基配列を有するオリゴヌクレオチドとをプライマーに用いて、1回～数回のPCRを行うことにより、配列番号1で示される塩基配列からなるDNAや、配列番号1で示される塩基配列において1もしくは複数の塩基が欠失、置換もしくは付加された塩基配列からなるDNAを増幅することができる。尚、このようなプライマーに用いるオリゴヌクレオチドは、配列番号1で示される塩基配列に基いて適宜設計することができ、また、その5'末端側に、制限酵素認識配列等を付加してもよい。

上記のようにして増幅されたDNAは、「Molecular Cloning:A Laboratory Manual 2nd edition」(1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press、「Current Protocols In Molecular Biology」(1987), John Wiley & Sons, Inc. ISBN0-471-5

0338-X等に記載される通常の方法に準じてベクターにクローニングすることができる。具体的には、例えばInvitrogen社のTAクローニングキットに含まれるプラスミドベクターやStratagene社のpBluescriptIIなどのプラスミドベクターを用いてクローニングすることができる。クローニングされたDNAの塩基配列は、F.S.anger, S.Nicklen, A.R.Coulson著、Proceedings of National Academy of Science U.S.A. (1977), 74, 5463頁-5467頁等に記載されるダイデオキシターミネーティング法などにより分析することができる。塩基配列分析用の試料調製には、例えば、パーキンエルマー社のABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kitなどの市販の試薬を用いてもよい。

上述のようにして得られるDNAの下流にレポーター遺伝子、例えば、 β -グルクロニダーゼ遺伝子を連結し、これを必要に応じてベクターにクローニングして、後述するパーティクルガン法、アグロバクテリウム菌感染法などの方法を用いて、例えば、タバコ培養細胞BY-2などの植物培養細胞に導入する。次いで、該培養細胞の細胞抽出液を調製してその β -グルクロニダーゼ活性を酵素学的手法により測定し該活性値を指標にするか、または、該培養細胞を5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル- β -D-グルクロン酸を添加した染色液中に浸して青色色素の沈着を観察し色素の沈着度を指標にすることにより、上記DNAのプロモーター機能の有無を確認し、本プロモーターDNAを得ることができる。また、同様にして、レポーター遺伝子に連結されてなる上記DNAを、例えばタバコ野性株細胞などの植物細胞に導入してこの細胞から植物体を再生させ、該植物体またはその子孫の各組織における β -グルクロニダーゼ活性を測定するか、または、該植物体またはその子孫の各組織またはその切片を、5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル- β -D-グルクロン酸を添加した染色液中に浸して青色色素の沈着を観察することにより、上記DNAのプロモーター機能を調べ、本プロモーターDNAを得ることもできる。尚、レポーター遺伝子としては、 β -グルクロニダーゼ遺伝子に限らず、ルシフェラーゼ遺伝子、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子、グリーンフルオレセイントプロテイン遺伝子等を使用することもできる。

【0008】

また、本プロモーターDNAは、例えば、配列番号1で示される塩基配列の少なくとも一部からなるDNAを標識し、これをプローブに用いて植物等由来のDNAにハイブリダイズさせ、該プローブが特異的に結合したDNAを検出しクローニングすることにより取得することもできる。

ここで、前記プローブをハイブリダイズさせるDNAとしては、例えば、ニンジンなどの植物由来のゲノムDNAライブラリー等を使用することができる。該DNAライブラリーには、市販のゲノムDNAライブラリーを用いることもできるし、また「Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd edition」(1989), Cold Spring Harbor Laboratory Pressや「Current Protocols In Molecular Biology」(1987), John Wiley & Sons, Inc. ISBN0-471-50338-X等に記載される通常のライブラリー作製法に従い、例えば、STRATAGENE社の λ FIX II、 λ EMBL3、 λ EMBL4、 λ DASH II等の λ ベクターを用い、STRATAGENE社のGigapack packaging Extracts等をin vitroパッケージングに用いてゲノムDNAライブラリーを作製し、これを用いることもできる。

このようなDNAにプローブをハイブリダイズさせる方法としては、コロニーハイブリダイゼーションやブランクハイブリダイゼーションをあげることができ、ライブラリーの作製に用いられたベクターの種類に応じて方法を選択するとよい。使用されるライブラリーがプラスミドベクターで構築されたライブラリーである場合には、コロニーハイブリダイゼーションを行なう。具体的にはまず、ライブラリーのDNAを宿主微生物に導入して形質転換体を取得し、得られた形質転換体を希釈して寒天培地にまき、コロニーが現れるまで37℃で培養を行う。また、使用されるライブラリーがファージベクターで構築されたライブラリーである場合には、ブランクハイブリダイゼーションを行なう。具体的にはまず、宿主微生物とライブラリーのファージを感染可能な条件下で混合した後さらに軟寒天培地と混合し、これを寒天培地上にまく。その後ブランクが現れるまで37℃で培養を行う。より具体的には、例えば、Molecular Cloning 2nd edition (J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis 著, Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989年) 2.60から2.65等に記載されている方法に準じて、NZY寒天培地に寒天培地1m²当り0.1~1.0pfuの密度で、約 9.0×10^5 pfuのファージライブラリーを広げ、37

℃で6～10時間培養する。

次いで、前記のいずれのハイブリダイゼーション法の場合も、前記の培養を行った寒天培地の表面にメンブレンをのせ、プラスミドを保有する形質転換体またはファージを該メンブレンに転写する。このメンブレンをアルカリ処理した後、中和処理し、次いで、DNAを該メンブレンに固定する処理を行なう。より具体的には例えば、ブランクハイブリダイゼーションの場合には、クローニングとシーケンス：植物バイオテクノロジー実験マニュアル（渡辺、杉浦編集、農村文化社1989年）等に記載の通常の方法に準じて、前記寒天培地の上にニトロセルロースメンブレン又はナイロンメンブレン等、例えば、Hybond-N+（アマシャム社登録商標）を置き、約1分間静置してファージ粒子をメンブレンに吸着させる。次に、該メンブレンをアルカリ溶液（1.5M 塩化ナトリウム、0.5N NaOH）に約3分間浸してファージ粒子を溶解させてファージDNAをメンブレン上に溶出させた後、中和溶液（1.5M 塩化ナトリウム、0.5M トリス-塩酸緩衝液、pH7.5）に約5分間浸す処理を行う。該メンブレンを洗浄溶液（300mM 塩化ナトリウム、30mM クエン酸ナトリウム、200mM トリス-塩酸緩衝液）で約5分間洗った後、例えば、約80℃で約90分間ベーキングすることによりファージDNAをメンブレンに固定する。

このように調製されたメンブレンを用いて、上記DNAをプローブとしてハイブリダイゼーションを行う。ハイブリダイゼーションは、例えば、D.M.Glover編「DNA cloning, a practical approach」IRL PRESS（1985）ISBN 0-947946-18-7、クローニングとシーケンス：植物バイオテクノロジー実験マニュアル（渡辺、杉浦編集、農村文化社1989年）、または、Molecular Cloning 2nd edition（J.Sambrook, E.F.Frisch, T.Maniatis著、Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989年）等の記載に準じて行なうことができる。

プローブに用いるDNAを放射性同位元素により標識するには、例えば、ベリンガー社、宝酒造社製のRandom Labelling Kit等を用いることができ、通常のPCR反応組成中のdCTPを $[\alpha - ^{32}\text{P}]$ dCTPに替えて、プローブに用いるDNAを鋳型にしてPCR反応を行うことにより、標識を行うこともできる。また、プローブに用いるDNAを蛍光色素で標識する場合には例えば、アマシャム社製のECL Dire

ct Nucleic Acid Labelling and Detection System等を用いることができる。

ハイブリダイゼーションを行う際の試薬及び温度条件は多種存在するが、例えば、450～900mMの塩化ナトリウム、45～90mMのクエン酸ナトリウムを含み、ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）を0.1～1.0%の濃度で含み、変性した非特異的DNAを0～200 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で含み、場合によってはアルブミン、フィコール、ポリビニルピロリドン等をそれぞれ0～0.2%の濃度で含んでもよいプレハイブリダイゼーション溶液、好ましくは、900mMの塩化ナトリウム、90mMのクエン酸ナトリウム、1%のSDS、100 $\mu\text{g/ml}$ の変性Calf-thymus DNAを含むプレハイブリダイゼーション溶液を、上記のようにして作製したメンブレン1 cm^2 当り50～200 μl の割合で準備し、該溶液に前記メンブレンを浸して42～68℃で1～4時間、好ましくは、45℃で2時間保温する。次いで、例えば、450～900mMの塩化ナトリウム、45～90mMのクエン酸ナトリウムを含み、SDSを0.1～1.0%の濃度で含み、変性した非特異的DNAを0～200 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で含み、場合によってはアルブミン、フィコール、ポリビニルピロリドン等をそれぞれ0～0.2%の濃度で含んでもよいハイブリダイゼーション溶液、好ましくは、900mMの塩化ナトリウム、90mMのクエン酸ナトリウム、1%のSDS、100 $\mu\text{g/ml}$ の変性Calf-thymus DNAを含むハイブリダイゼーション溶液と、前述の方法で調製して得られたプローブ（メンブレン1 cm^2 当り $1.0 \times 10^4 \sim 2.0 \times 10^6$ cpm相当量）とを混合した溶液をメンブレン1 cm^2 当り50～200 μl の割合で準備し、該溶液にメンブレンを浸し42～68℃で4～20時間、好ましくは、45℃で16時間保温しハイブリダイゼーション反応を行う。該ハイブリダイゼーション反応後、メンブレンを取り出し、15～300mMの塩化ナトリウム、1.5～30mMのクエン酸ナトリウム、0.1～1.0%のSDS等を含む42～68℃の洗浄溶液等、好ましくは、300mMの塩化ナトリウム、30mMのクエン酸ナトリウム、1%のSDSを含む55℃の洗浄溶液で、10～60分間のメンブレン洗浄を1～4回、好ましくは15分間の洗浄を2回行う。さらに、メンブレンを2×SSC溶液（300mM 塩化ナトリウム、30mM クエン酸ナトリウム）で軽くすすいだのち乾燥させる。このメンブレンを、例えば、オートラジオグラフィーなどに供してメンブレン上のプローブの位置を検出することにより、用いたプローブとハイブリダイズするDNAのメンブレン上の位置を検出する。検出されたDNAのメンブレン上の位置に相当するクローンをもとの

寒天培地上で特定しこれを釣菌することにより、当該DNAを有するクローンを単離することができる。具体的には例えば、メンブレンをイメージングプレート（富士フィルム）に4時間露光させ、次いでこのイメージングプレートをBAS2000（富士フィルム）を用いて解析し、シグナルを検出する。該メンブレンの作製に用いた寒天培地のうち、シグナルが検出された位置に相当する部分を約5mm角にくり抜き、これを約500 μ lのSMバッファ（50mM トリス-塩酸緩衝液 pH7.5、0.1M 塩化ナトリウム、7mM硫酸マグネシウム、0.01%ゼラチン）に2～16時間、好ましくは3時間浸してファージ粒子を溶出させる。得られたファージ粒子溶出液をMolecular Cloning 2nd edition (J.Sambrook, E.F.Frisch, T.Maniatis著、Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989年) 2.60から2.65に記載の方法に準じて寒天培地に広げ、37℃で6～10時間培養する。この寒天培地を用いて前述の方法と同様の方法でファージDNAをメンブレンに固定し、このメンブレンと前述のプロブを用いてハイブリダイゼーションを行う。該メンブレンの作製に用いた寒天培地のうちの、シグナルが検出された位置に相当する部分からファージ粒子を溶出し、これを寒天培地に広げ、前述の方法と同様にメンブレンを作製し、ハイブリダイゼーションを行う。このようなファージクローンの特定と純化を繰り返すことにより、用いたプロブとハイブリダイズする塩基配列を有するDNAを含むファージクローンが得られる。

前述のようなハイブリダイゼーションによるスクリーニングを行うことにより得られたクローンの保有するDNAは、DNA調製や解析が容易なプラスミドベクター、例えば市販のpUC18、pUC19、pBLUESCRIPT KS+、pBLUESCRIPT KS-等にサブクローニングして、プラスミドDNAを調製し、F.Sanger, S.Nicklen, A.R.Coulson著、Proceedings of National Academy of Science U.S.A., (1977), 74, 5463頁-5467頁等に記載されるダイデオキシターミネーティング法を用いてその塩基配列を決定することができる。塩基配列分析に用いる試料の調製は、例えば、Molecular Cloning 2nd edition (J.Sambrook, E.F.Frisch, T.Maniatis著、Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989年) 13.15等に記載されているプライマーエクステンション法に準じて行うことができる。また、ファージクローンをMolecular Cloning 2nd edition (J.Sambrook, E.F.Frisch, T.Maniatis著、Cold Spring

ng Harbor Laboratory Press 1989年) 2.60から2.65等に記載の方法に準じてNZYM液体培地で増幅し、ファージ液を調製して、これから例えば、Lambda-TRAP PLUS DNA Isolation Kit (Clontech社製) 等を用いてファージクローンDNAを抽出し、該DNAを鋳型として、例えば、前述のプライマーエクステンション法により塩基配列分析用の試料を調製し、塩基配列を分析することもできる。

このようにして得られるDNAのプロモーター機能を前述のようにして調べることにより、本プロモーターDNAが得られる。

【0009】

本プロモーターDNAは、配列番号1で示される塩基配列からなるDNAの塩基配列に変異を導入することによっても取得され得る。具体的には、例えば、A.Greener, M.Callahan, Strategies, 1994年、7巻、32-34頁等に記載される方法により配列番号1で示される塩基配列からなるDNAにランダムに変異を導入してもよいし、W.Kramer, et al., Nucleic Acids Research, 1984年、12巻、9441頁もしくはW. Kramer, H.J.Frits, Methods in Enzymology, 1987年、154巻、350頁等に記載のギャップド・デュプレックス (gapped duplex) 法、または、T.A.Kunkel, Proc. of Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1985年、82巻、488頁もしくはT.A.Kunkel, et al., Methods in Enzymology, 1987年、154巻、367頁等に記載のクンケル (Kunkel) 法等に準じて、配列番号1で示される塩基配列からなるDNAに部位特異的に変異を導入してもよく、あるいは、配列番号1で示される塩基配列の一部において1もしくは複数の塩基が欠失、置換もしくは付加された塩基配列を有するオリゴヌクレオチドをプライマーに用いてPCRを行ない、配列番号1で示される塩基配列において1もしくは複数の塩基が欠失、置換もしくは付加された塩基配列からなるDNAを増幅することもできる。また、配列番号1で示される塩基配列のうち1ヶ所ないし数カ所の部分塩基配列を、他のプロモーターの塩基配列の一部と入れ換えたキメラDNAを作製してもよく、例えば、S.Henikoff, et al., Gene, 1984年、28巻、351頁、C.Yanisch-Perron, et al., Gene, 1985年、33巻、103頁等に記載された方法により、配列番号1で示される塩基配列の一部を欠失した塩基配列を有するDNAを調製してもよい。このようにして得られるDNAのプロモーター機能を前述のようにして調べることにより、本プロモ

ーターDNAが取得され得る。

【0010】

本発明プロモーターは、上述のようにして得られる本プロモーターDNAのうち前記(a)、(b)のDNAのいずれか一方を含んでいてもよいし、(a)、(b)のDNAを共に含んでいてもよく、また、これらを反復して含んでいてもよい。

さらに、本発明プロモーターは、植物において遺伝子の転写効率を増大させる効果を有する塩基配列を含んでいてもよい。該塩基配列としては、植物において、例えば、構成的に転写効率増大効果を示す配列であってもよく、種特異的、組織特異的または時期特異的にその転写効率増大効果を示す配列であってもよく、病原微生物の感染や、光、熱、乾燥、塩または傷害などのストレス等によりその転写効率増大効果が誘導される配列であってもよい。植物において遺伝子を転写する効率を増大させる効果を有する塩基配列の具体例としては、例えば、アグロバクテリウムのオクトピン合成酵素遺伝子の転写開始点の上流333番目の塩基から同じく116番目の塩基までの領域の下流に、マンノピン合成酵素遺伝子の転写開始点の上流318番目の塩基から同じく138番目の塩基までの領域が連結されてなる転写翻訳活性化配列、マンノピン合成酵素遺伝子の転写開始点の上流318番目の塩基から同じく213番目の塩基までの領域の下流に、オクトピン合成酵素遺伝子の転写開始点の上流333番目の塩基から同じく116番目の塩基までの領域が連結されてなる転写翻訳活性化配列 (The Plant Journal, 7(4):661-676(1995))、カリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーターの転写開始点の上流343番目の塩基から同じく91番目の塩基までを含む塩基配列 (Nature, 313:810-812(1985))、トマトのリブローサー1, 5-二リン酸カルボキシラーゼ・オキシダーゼ小サブユニット遺伝子 (rbc-3A) の転写開始点の上流1099番目の塩基から同じく205番目の塩基までを含む塩基配列 (Plant Cell, 1:217-227(1990))、タバコのPR1a遺伝子の転写開始点の上流902番目の塩基から同じく287番目の塩基までを含む塩基配列 (Plant Cell, 2:357-366(1990))、ジャガイモのプロテアーゼインヒビター遺伝子 (PI-II) の転写開始点の上流1300番目の塩基から同じく195番目の塩基までを含む塩基配列 (Plant Cell, 2:61-70(1990)) 等があげられる。

また、本発明プロモーターは、配列番号1で示される塩基配列に含まれる転写効率増大効果を有する塩基配列も含み得る。さらに、かかる塩基配列を同定し、例えば、該塩基配列を反復して含む本発明プロモーターを作製することもできるし、植物細胞においてプロモーター機能を有する他のDNAと該塩基配列とを連結することにより、新たな植物プロモーターを作出することもできる。該塩基配列を同定するには、例えば、植物細胞において種々の本プロモーターDNAの制御下にレポーター遺伝子を発現させ、その発現量を比較することにより、転写効率増大効果に寄与する塩基配列を解析するとよい。より具体的には、例えば、配列番号1で示される塩基配列において1もしくは複数の塩基が欠失もしくは置換された塩基配列からなるDNAを複数調製し、それぞれの下流にレポーター遺伝子、例えば、 β -グルクロニダーゼ遺伝子を連結し、これらを後述するパーティクルガン法、アグロバクテリウム菌感染法などの方法を用いて、例えば、タバコ培養細胞BY-2などの植物培養細胞に導入する。次いで、該培養細胞の細胞抽出液を調製してその β -グルクロニダーゼ活性を酵素学的手法により測定し該活性値を指標にするか、または、該培養細胞を5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル- β -D-グルクロン酸を添加した染色液中に浸して青色色素の沈着を観察し色素の沈着度を指標にして、各細胞におけるレポーター遺伝子の発現量を比較し、その結果をレポーター遺伝子と連結された上記DNAの塩基配列と対比することにより、転写効率増大効果に寄与する塩基配列を明らかにすることができる。また、同様にして、レポーター遺伝子に連結されてなる上記DNAを、例えばタバコ野性株細胞などの植物細胞に導入してこの細胞から植物体を再生させ、該植物体またはその子孫の各組織における β -グルクロニダーゼ活性を測定するか、または、該植物体またはその子孫の各組織またはその切片を、5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル- β -D-グルクロン酸を添加した染色液中に浸して青色色素の沈着を観察することにより、上記各DNAにより制御されたレポーター遺伝子の発現量を比較し、転写効率増大効果に寄与する塩基配列を明らかにすることもできる。

【0011】

本発明において、「ターミネーター機能」とは、ターミネーターとして作用す

る能力、すなわち、遺伝子の転写の終結を指令する作用を意味し、「植物細胞内で機能可能なターミネーター」とは、植物においてターミネーター機能を有するDNAをいう。本発明ターミネーターは、具体的には、以下の(c)または(d)のDNA(以下、本ターミネーターDNAと記す。)を含む。

(c) 配列番号2で示される塩基配列からなるDNA

(d) 配列番号2で示される塩基配列において1もしくは複数の塩基が欠失、置換もしくは付加された塩基配列からなり、かつ、植物細胞においてターミネーター機能を有するDNA

このような塩基の欠失、置換または付加には、DNAの取得源に用いられた生物の種差、個体差、組織間の差異等により天然に生じる変異や、DNAに人為的に導入された変異等が含まれる。かかるDNAは、自然界からクローニングされたDNAであっても、自然界からクローニングされたDNAに人為的に塩基の欠失、置換または付加が導入されたDNAであっても、人為的に化学合成されたDNAであってもよい。

【0012】

本ターミネーターDNAは、配列番号2で示される塩基配列に基いて、前述の本プロモーターDNAの取得方法に準じて取得することができる。具体的には、例えば、ニンジン等の植物由来のゲノムDNAを鋳型にして、配列番号2の塩基番号1から20で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドと、配列番号2の塩基番号827から851で示される塩基配列に相補的な塩基配列を有するオリゴヌクレオチドとをプライマーに用いて、1回～数回のPCRを行う方法をあげることができる。

尚、本ターミネーターDNAの植物細胞におけるターミネーター機能を確認するには、例えば、植物細胞内で機能可能なプロモーター、レポーター遺伝子、例えば β -グルクロニダーゼ遺伝子および本ターミネーターDNAを β -グルクロニダーゼ遺伝子が発現可能な形で連結し、一方、対照として、前記プロモーターおよび β -グルクロニダーゼ遺伝子を同様に連結し、これらをそれぞれ、後述するパーティクルガン法、アグロバクテリウム菌法などを用いて、例えばタバコ培養細胞BY-2などの植物培養細胞に導入する。次いで、それぞれの細胞の細胞

抽出液を調製してその β -グルクロニダーゼ活性を測定し該活性値を指標にするか、または、該細胞を5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル- β -D-グルクロン酸を添加した染色液中に浸して青色色素の沈着を観察し色素の沈着度を指標にすることにより、プロモーター、 β -グルクロニダーゼ遺伝子および本ターミネーターDNAを連結して導入した植物細胞において、対照より β -グルクロニダーゼ遺伝子の発現量が高いことを確認する。また、同様にして、植物細胞内で機能可能なプロモーター、 β -グルクロニダーゼ遺伝子および本ターミネーターDNAを連結し、一方、対照として、前記プロモーターおよび β -グルクロニダーゼ遺伝子を同様に連結し、これらをそれぞれ、タバコ野生株細胞などの植物細胞に導入して該細胞から植物体を再生させる。再生した植物体またはその子孫の各組織における β -グルクロニダーゼ活性を測定するか、または、該植物体またはその子孫の各組織またはその切片を、5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル- β -D-グルクロン酸を添加した染色液中に浸して青色色素の沈着を観察することにより、本ターミネーターDNAの機能を調べることができる。

【0013】

本発明プロモーターを用いて所望の遺伝子を植物細胞内で発現させるには、本発明プロモーター、所望の遺伝子および植物ターミネーターが機能可能な形で連結されてなる遺伝子（以下、本発明キメラ遺伝子と記す。）を利用するとよい。ここで、所望の遺伝子とは、植物で発現させようとする遺伝子であって、例えば、酵素、貯蔵タンパク質、受容体、転写調節因子、シグナル伝達因子などのタンパク質をコードする遺伝子があげられ、これらの遺伝子は本発明プロモーターの下流に目的に応じてセンスまたはアンチセンス方向に結合するとよい。植物ターミネーターとしては、導入される植物において転写終結作用を有するDNAであれば特に制限はなく、例えば、アグロバクテリウム属細菌のTi-プラスミド由来のノパリン合成酵素遺伝子のターミネーター（NOS）、ニンクウイルスGV1, GV2等の植物ウイルス由来のターミネーターなどを挙げることができ、本発明ターミネーターを用いることもできる。また、本発明キメラ遺伝子は、本発明プロモーターの塩基配列、またはその一部を反復した形で含んでいてもよい。尚、「機能可能な形で」とは、本発明キメラ遺伝子を導入し植物細胞を形質転換させたとき

に、該キメラ遺伝子に含まれる目的の遺伝子が、本発明プロモーターおよび植物ターミネーターの制御下に発現するように、これらのプロモーターおよびターミネーターと結合された状態にあることを意味する。

【0014】

本発明プロモーターを有するベクターにおいて、ベクターとは、細胞内で増殖可能なDNAであって、大腸菌、酵母、植物細胞、動物細胞等の細胞内で増幅可能なプラスミド、ファージ、ファージミッド等があげられ、宿主細胞や用途に応じて選択する。具体的には、例えば、pUC系プラスミド[pUC118,pUC119(宝酒造社)など]、pSC101系プラスミド、Ti-プラスミド[pBI101,pBI121(CLONTECH社)など]、ブルースクリプト系ファージミッド[pBluescript SK(+/-)(STRATAGENE社)など]、M13系ファージ[mp10,mp11(Amersham社)など]、λ系ファージ[λgt10,gt11(Amersham社)など]、コスミッド類[SuperCosI(STRATAGENE社)など]等が挙げられ、この様なベクターに本発明プロモーターを組み込むことにより、本発明プロモーターを有するベクターを構築することができる。

前記のような本発明プロモーターを有するベクターにおいて、該プロモーターの下流に遺伝子挿入部位および植物ターミネーターがさらに有ると、所望の遺伝子を植物細胞内で発現させるためのベクターの構築等に好ましく利用できる。ここで遺伝子挿入部位とは、例えば、遺伝子工学的手法で通常用いられる制限酵素が特異的に認識切断可能な塩基配列であり、本発明プロモーターおよび植物ターミネーターを有するベクター上に唯一存在する種類の制限酵素認識配列が好ましい。この様な遺伝子挿入部位、本発明プロモーターおよび植物ターミネーターは、該遺伝子挿入部位へ所望の遺伝子が挿入された際に、ベクター上で本発明プロモーター、所望の遺伝子および植物ターミネーターが機能可能な形で連結されるような位置にあることが好ましい。かかるベクターは、例えば、遺伝子挿入部位および植物ターミネーターを含むプラスミド、具体的には、pBI101.3(CLONTECH社製)等のマルチクローニング部位(遺伝子挿入部位)に、本発明プロモーターのDNAを挿入することにより構築することができる。また、遺伝子挿入部位を有するベクター、具体的には、pBIN19(Nucl. Acid Res. 12:8711-8721(1984))等のマルチクローニング部位(遺伝子挿入部位)に本発明プロモーターと植物ター

ミネーターを挿入することによっても構築することができる。

本発明キメラ遺伝子を有するベクターは、該キメラ遺伝子の宿主細胞への導入に好ましく使用することができ、例えば、該キメラ遺伝子を上記のようなベクターにクローニングするか、または、本発明プロモーター、遺伝子挿入部位および植物ターミネーターを有する上記のようなベクターの遺伝子挿入部位に所望の遺伝子をクローニングすることにより調製することができる。例えば、pBI101.3(C LONTECH社製)を用いて作製した上記のようなベクターを制限酵素を用いて切断することにより該ベクター上に存在するレポーター遺伝子(β -グルクロニダーゼ遺伝子)を除去し、該レポーター遺伝子に換えて所望の遺伝子を挿入することによって、本発明キメラ遺伝子を有するベクターを調製することができる。

上述のような本発明のベクターは、本発明プロモーター、発現させようとする所望の遺伝子や植物ターミネーターの他に、該ベクターが導入された宿主細胞を選択するためのマーカー遺伝子(例えば、カナマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子、植物に除草剤耐性を付与し得る遺伝子等)を含んでいてもよい。また、該ベクターは、本発明プロモーターの塩基配列を反復した形で含んでいてもよい。

【0015】

本発明のベクターは、例えば、J., Sambrook, E., F., Frisch, T., Maniatis 著、モレキュラー・クローニング第2版(1989)(コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー発行)等に記載の塩化カルシウム法、エレクトロポレーション法等により大腸菌やアグロバクテリウム菌に導入することができ、本発明ベクターの導入されたかかる微生物細胞(形質転換体)は、本発明キメラ遺伝子DNAの調製や該キメラ遺伝子の植物細胞への導入等に有用である。

また、本発明プロモーターをコードするDNAや本発明キメラ遺伝子のDNAは、パーティクルガン法(パーティクルガンによる植物組織または培養細胞への直接導入法)等により、植物細胞に導入することができる。また、本発明のベクターは、例えば、アグロバクテリウム菌感染法(アグロバクテリウム菌を植物組織に感染させる方法)、電気的導入法(エレクトロポレーション法やプロトプラストへの電気的導入法)、またはパーティクルガン法等の公知の方法により植

物細胞に導入することができる。

【0016】

本発明プロモーター、本発明キメラ遺伝子や本発明ベクターを導入し、本発明プロモーターの制御下に遺伝子を発現させることができる植物種としては、例えば、イネ、トウモロコシ、オオムギ、コムギ等の单子葉植物、ダイズ、エンドウ、インゲン、アルファルファ等のマメ科植物、タバコ、トマト、ジャガイモ等のナス科植物、キャベツ、ナタネ、カラシナ等のアブラナ科植物、メロン、カボチャ、キュウリ等のウリ科植物、ニンジン、セロリ等のセリ科植物、レタス等のキク科植物等の双子葉植物を挙げることができる。

本発明プロモーター、本発明キメラ遺伝子または本発明のベクターを上記のように植物の細胞へ導入し形質転換体を得ることにより、例えば、本発明プロモーターがゲノムDNA上の所望の遺伝子の近位に挿入され該遺伝子を本発明プロモーターの制御下に発現する植物細胞、本発明キメラ遺伝子がゲノムDNA上に挿入され該キメラ遺伝子に含まれる遺伝子を本発明プロモーターの制御下に発現する植物細胞、本発明キメラ遺伝子を有するベクターを細胞内に有し該キメラ遺伝子に含まれる遺伝子を本発明プロモーターの制御下に発現する植物細胞などが得られる。

上記のような形質転換された植物細胞は、例えば、S.B.Gelvin, R.A.Schilperoot and D.P.S.Verma著：プラント・モレキュラー・バイオロジー・マニュアル (Plant Molecular Biology Manual, Kluwer Academic Publishers press (1988))、島本功、岡田清孝監修：モデル植物の実験プロトコール (イネ、シロイヌナズナ編) (秀潤社) (ISBN4-87962-157-9 C3345,1996)78-143頁あるいは内宮博文著 (植物遺伝子操作マニュアル、トランスジェニック植物の作り方 (講談社サイエンティフィック)) 1990, ISBN4-06-153513-7 C3045)28-33頁に記載されている通常の植物組織培養技術において用いられる方法に準じて再分化することによって、該植物細胞由来の形質転換された植物体またはその一部を得ることができる。さらに、前記のようにして得られる植物体を栽培し自殖させることにより、該植物体の子孫が得られる。

尚、上述のような形質転換された植物細胞や植物体より、常法に従ってDNA

を抽出し、このDNAを制限酵素で切断し、宿主細胞の形質転換に用いたDNAまたはその一部をプローブに用いてサザンハイブリダイゼーションを行うことにより、遺伝子導入の有無を確認することができる。また、かかる植物細胞や植物体より、常法に従ってRNAを抽出し、本発明プロモーターの制御下に発現させようとする目的の遺伝子のセンスまたはアンチセンス配列を有するオリゴヌクレオチドまたはDNAをプローブに用いてノザンハイブリダイゼーションを行うことにより、目的遺伝子の発現の状態を調べることができる。

【0017】

本発明プロモーターの制御下に特定の遺伝子をセンス方向に連結し植物で発現させることにより、植物に有用な形質を付与することができる。例えば、フェニールアラニンアンモニアリアーゼ遺伝子 (PAL)、カルコンシンターゼ遺伝子 (CHS)、キチナーゼ遺伝子 (CHT)、リゾチーム遺伝子もしくはPRタンパク質遺伝子等の植物防御遺伝子、Pto遺伝子等の病害抵抗性遺伝子、ウイルスコートタンパク質遺伝子またはBT (*Bacillus thuringiensis*) 殺虫タンパク質遺伝子等を発現させることにより、植物組織において細菌、カビ、ウイルス、昆虫等に対する抵抗性を増強することができる。また、例えば、ダイズのグリシニン遺伝子、 β -コングリシニン遺伝子等の貯蔵タンパク質遺伝子を発現させることにより、飼料作物における種々のタンパク質含量や必須アミノ酸含量を増加させることができ、ブラジルナッツの2Sアルブミン遺伝子、トウモロコシやイネの10kDa及び15kDaタンパク質遺伝子等を発現させることにより、飼料作物のメチオニン含量あるいはリジン含量を増加させることができ、大腸菌等の微生物由来のbioA、bioB、bioC、bioD、bioF、bioH 酵素遺伝子等のビオチン生合成関連酵素遺伝子を発現させることにより、飼料作物におけるビオチン含量を増加させることができ、さらにステアロイル-ACP-デサチュレーズ、アシル-ACP-チオエステラーゼ、3-ホスフェートアシルトランスフェラーゼ遺伝子等を発現させることにより、脂質の酸化安定性の向上、リン脂質の減少及びオレイン酸とリノレン酸の増加による脂質の改良が可能となり、アシルトランスフェラーゼ遺伝子等を発現させることにより、不飽和脂肪酸の割合を増加させ低温に対する抵抗性を増大させることができる。また、カナマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子、ネオマイシン

耐性遺伝子等の抗生物質耐性に関与する遺伝子を発現させることにより、形質転換体の選択に有用な抗生物質耐性を付与することもできる。さらに、例えば、L-ホスフォノスリシンアセチル化酵素、(PAT)合成酵素もしくはプロトポルフィリノーゲン酸化酵素(PP0)遺伝子等の除草剤抵抗性に関与する遺伝子を発現させることにより、除草剤抵抗性作物を作出することもできる。

一方、本発明プロモーターの制御下に特定の遺伝子をアンチセンス方向に連結し植物細胞内で発現させることにより、植物に有用な形質を付与することもできる。例えば、イネのイソメラーゼ(Isomerase)などのアミロペクチン分解酵素遺伝子のアンチセンス遺伝子を発現させることによりイネ種子中のデンプン成分を改良することができ、カボチャ等の1-アミノシクロプロパン-1-カルボキシレート(ACC)合成酵素などのエチレン合成酵素遺伝子のアンチセンス遺伝子を発現させることにより果物、花などの保存性を向上することができ、また、トマトのポリガラクトクロナーゼ遺伝子のアンチセンス遺伝子を発現させることにより果物の保存性を向上することができる。

さらに、植物の自家不和合性に関与しているS-ローカス型特異的RNase遺伝子等の雄性不稔関連遺伝子のセンスまたはアンチセンス遺伝子を発現させることにより、植物の稔性を制御することもできる。

【0018】

【実施例】

以下、実施例を挙げてさらに詳細に本発明を説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

実施例1 (本発明プロモーター、本発明ターミネーターの単離)

ニンジン葉部より調製したゲノムDNAを用いてインバース・ポリメラーゼ・チェーン・リアクション(インバースPCR)を行い、本発明プロモーター、本発明ターミネーターを取得した。以下にその方法について説明する。

(1) ニンジンゲノムDNAの調製

播種後6週目のニンジン葉部10gを液体窒素中で磨砕し、5mlの2xCTAB液(2% Cetyltrimethyl ammonium bromide、100mM トリス-塩酸緩衝液 pH8.0、20mM EDTA pH8.0、1.4M 塩化ナトリウム、1% β-リニール)に懸濁後、55℃で10分間保温

した。これに等量のクロロホルム/イソアミルアルコール (24:1) を加え、室温で30分間穏やかに混合した後遠心分離し、上層と下層とを分取した。①上層には等量のクロロホルム/イソアミルアルコール (24:1) を加え、②下層には等量の1xCTAB液 (2xCTAB液を滅菌蒸留水で2倍に希釈した液) を加え、それぞれ室温で10分間穏やかに混合した後、再度遠心分離し、①、②それぞれより上層を分取してこれらを混合した。これに1/10量の10%CTAB液 (10% Cetyltrimethyl ammonium bromide、0.7M 塩化ナトリウム) および等量の沈殿バッファー (2% Cetyltrimethyl ammonium bromide、50mM トリス-塩酸緩衝液 pH8.0、10mM EDTA pH8.0) を加え、穏やかに混合した後遠心分離した。沈殿物を回収しこれを1M塩化ナトリウム-TE (1M 塩化ナトリウム、10mM トリス-塩酸緩衝液 pH8.0、1mM EDTA pH8.0) に懸濁し、さらに等量のイソプロパノールを加えて穏やかに混合した後、遠心分離し、得られた沈殿物を70%エタノールでリンスして軽く乾かし、これをTEに懸濁した。該懸濁液に最終濃度10 μ g/mlになるようにRNaseを加え、37℃で30分間保温した後、1/4量の4M酢酸アンモニウムと2倍量の100%エタノールとを加えて混合し静置した。析出したDNAをパスツールピペットで巻き取って回収後、70%エタノールでリンスして軽く乾かしTE (10mM トリス-塩酸緩衝液 pH8.0、1mM EDTA pH8.0) に懸濁した。このDNA液を適当に希釈し、吸光度測定、アガロースゲル電気泳動に供した。その結果、約 350 μ gのゲノムDNAが得られたことが確認された。

【0019】

(2)PCRによる本発明プロモーターおよび本発明ターミネーターを含むDNAの増幅
(1)で得られたゲノムDNA10 μ gにPvuII 100Uを作用させてこれを完全消化した後、1/10量の3M酢酸ナトリウムと2倍量の100%エタノールとを加えて混合し、15000rpm、10分間、4℃で遠心分離して、沈殿したDNAを回収した。これを70%エタノールでリンスし、最終濃度が20ng/ μ lになるようにTEに懸濁した。このDNA溶液とライゲーションキット (宝酒造製) を用いて最終濃度が1ng/ μ lになるように、反応体積400 μ lでライゲーション反応させた後、該反応液を鋳型にして、下記の塩基配列を有するオリゴヌクレオチド A および B、
オリゴヌクレオチド A ; 5'-GGGTT TCAAT GGATT CGATG -3' (20mer)

オリゴヌクレオチド B ; 5'- GCAGA TGCTC AGAAC ACTGC -3' (20mer)

を用いてPCR反応 (94℃1分間、次いで55℃2分間、さらに74℃3分間の保温を1サイクルとして40サイクル) を行った。さらにこのPCR反応液の一部と、下記の塩基配列を有するオリゴヌクレオチド C および D、

オリゴヌクレオチド C ; 5'- GGCAG CTGGC ACCCA TGATA TTTAG AATG -3' (29mer)

オリゴヌクレオチド D ; 5'- GGCAG CTGTT CATAA TTTAC AGAGT GAGTG ACAGT CAG -3' (38mer)

を用いてPCR反応 (94℃1分間、次いで55℃2分間、さらに74℃3分間の保温を1サイクルとして40サイクル) を行った。反応後の溶液の一部を0.8%アガロースゲルで分析したところ、約3kbのDNA断片が増幅していることが確認された。

【0020】

(3) 本発明プロモーターおよび本発明ターミネーターのクローニングとシーケンシング

(2)で得られたPCR反応液にTEを添加して200 μ lに調整し、これに等量の中和フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール (24:23:1) を添加して十分混合した後、15000rpm、20℃、5分間遠心分離し、上層を分取した。これに1/10量の3M酢酸ナトリウムおよび2倍量の100%エタノールを添加して混合した後、15000rpm、4℃、10分間遠心分離し、沈澱したDNAを回収した。該DNAを70%エタノールでリンスした後TEに懸濁し、PvuII 30Uを作用させて完全消化した。該反応後、上記と同様にフェノール処理、エタノール沈澱を行い、回収したDNAを50 μ lのTEに懸濁し、スピンカラムS-400 (ファルマシア社製) に供して精製した。該カラムからの溶出液1 μ lを0.8%アガロースゲルで分析した結果、約2kbと約1kbのサイズのDNA断片が存在することが判った。pUC18ベクター2 μ gにSmaI 10Uを作用させて完全消化した後、さらにアルカリフォスファターゼ (宝酒造製) を作用させて脱リン酸化反応を行った。該反応液について上記と同様にフェノール処理、エタノール沈澱を行ってベクターDNAを回収しこれをTEに懸濁した。このベクターDNA 50ngと上記のインサート50ngとをライゲーションキット (宝酒造製) を用いてライゲーション反応に付した後、大腸菌JM109株のコンピテントセル (宝酒造製) に導入した。該導入処理を行なった菌株をアンピシリン100 μ g/mlを含むL

B培地上で培養し、生育してきたクローンからプラスミドDNAを調製した。このDNAを制限酵素で切断してアガロースゲル電気泳動することにより、目的とする約2 kbまたは約1 kbのサイズのDNA断片を含有するクローンの候補をそれぞれ選抜した。該候補クローンの有するDNAの塩基配列を、pUC18ベクターに存在する塩基配列を有するオリゴヌクレオチド E および F、

オリゴヌクレオチド E ; 5'- AACAA TTTCA CACAG GAAAC AGCTA TGACC -3' (30mer)

オリゴヌクレオチド F ; 5'- CAGTC ACGAC GTTGT AAAAC GACGG CCACT -3' (30mer)

をプライマーに用い、Taq Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing Kit (ABI)、蛍光シーケンサー (ABI) を用いて分析した。明らかとなった塩基配列をもとにオリゴヌクレオチド を合成し、これをプライマーに用いて前述と同様に塩基配列を分析することにより、配列番号 1 で示される塩基配列および配列番号 2 で示される塩基配列を決定した。

【0021】

実施例2 (本発明プロモーターを導入したトランスジェニック植物の作製)

(1) Tiプラスミド発現ベクターの構築

実施例1で得られた配列番号 1 で示される塩基配列を有するプラスミドを鋳型にして、クローニング用の制限酵素認識配列を有する下記の塩基配列を有するオリゴヌクレオチド G 及び H、

オリゴヌクレオチド G ; 5'- GGAAG CTTCA TGTGT GCCCT ACAGC ACA -3' (28mer)

オリゴヌクレオチド H ; 5'- GGTCT AGAGA TATTT AGAAT GTTAT TGCTG -3' (30mer)

を合成し、これをプライマーに用いてPCR反応 (94℃1分間、次いで55℃2分間、さらに74℃3分間の保温を1サイクルとして40サイクル) を行った。増幅したDNA断片にHindIII 10U、XbaI 10Uを作用させて完全消化した後、一部を0.8%アガロースゲルで分画し、約1.7 kbのサイズのDNAバンドを切り出してこれに含まれるDNAをガラスビーズ (バイオラッド社製) を用いて精製した。同様に残りの溶液を4% Nusieve Agarose ゲルで分画し、約250 bpのサイズのバンドを切り出してこれに含まれるDNAを精製した。pBIN19由来のベクター pIG121HM2 μ g をHindIII 10U、XbaI 10Uで消化し、さらにアルカリフォスファターゼを作用させて脱リン酸化反応を行った後、前記と同様にフェノール処理、エタノール沈澱を行って

ベクターDNAを回収した。該ベクターDNAと上記の2種のDNA断片（約1.7kb、約250bp）とをライゲーションキットを用いてライゲーション反応に供した後、大腸菌HB101株のコンピテントセル（宝酒造製）に導入し、該導入処理を行なった菌株をカナマイシン50 μ g/mlを含むLB培地上で培養した。生育してきたクローンからプラスミドDNAを調製し、これを制限酵素HindIII、XbaIで切断してアガロースゲル電気泳動で分析することにより、上記の約1.7kbのDNAと約250bpのDNA断片の両方を含むプラスミドを選抜した。さらに選抜したプラスミドDNAを鋳型にして、前述のオリゴヌクレオチドG及びH、

オリゴヌクレオチドG；5'-GGAAG CTTCA TGTGT GCCCT ACAGC ACA -3' (28mer)

オリゴヌクレオチドH；5'-GGTCT AGAGA TATTT AGAAT GTTAT TGCTG -3' (30mer)

をプライマーに用いてPCR反応（94℃1分間、次いで55℃2分間、さらに74℃3分間の保温を1サイクルとして40サイクル）を行い、約2kbのDNA断片が増幅することを確認し、 β -グルクロニダーゼ遺伝子上流に本発明プロモーターを有するTiプラスミド発現ベクター、pBICR16G6P（図3）を取得した。

【0022】

(2) トランスジェニック植物の取得

以下のトランスジェニック植物の作製は、S.B.Gelvin、R.A.Schilperoort and D.P.S.Verma著；Plant Molecular Biology/Manual (1988) (Kluwer Academic Publishers発行、Valvekens et al.Proc.Natl.Acad.Sci.,85:5536-5540 (1988) に記載の方法に準じて行った。

アグロバクテリウム菌C58C1をYEB培地中で、30℃にて一晩振とう培養した後、新たなYEB培地に植え継ぎ、培養液の濁度がOD600=0.6に達するまで培養した。以下の操作は、低温室にて行った。この培養液を遠心分離して菌体を集め、これを冷やしておいた滅菌蒸留水に懸濁した後、再度遠心分離して集菌した。この菌体の洗いを2回繰り返し、さらに滅菌蒸留水を10%グリセロール溶液に変えて同様の操作を行った。こうして得られた菌体を培養液の400倍濃縮になるように10%グリセロール溶液に懸濁した。このようにして調製した菌体懸濁液に、上記のようにして構築した本発明プロモーターを有するTiプラスミド発現ベクター pBICR16G6Pまたは対照としてpIG121HMベクターを、エレクトロポレーション法を用いて導

入し、導入処理を行なった菌株をカナマイシン $50\mu\text{g/ml}$ を含むYEBプレート上で培養した。生育してきたカナマイシン耐性クローンからアルカリ-SDS法によりプラスミドDNAを調製し、該DNAを0.8%アガロースゲル電気泳動で分析し、ゲルをエチジウムブロマイド染色してDNAバンドを検出することにより、Tiプラスミド発現ベクターが導入されていることを確認した。さらにこのプラスミドDNAを鋳型にして、前述のオリゴヌクレオチド G 及び H、

オリゴヌクレオチド G ; 5'- GGAAG CTTCA TGTGT GCCCT ACAGC ACA -3' (28mer)

オリゴヌクレオチド H ; 5'- GGTCT AGAGA TATTT AGAAT GTTAT TGCTG -3' (30mer)

をプライマーに用いてPCR反応(94℃1分間、次いで55℃2分間、さらに74℃3分間の保温を1サイクルとして40サイクル)を行い、約2kbのDNA断片が増幅することを確認し、目的の発現ベクターが導入されていることを確認した。

無菌培養したタバコの葉部切片(0.7cm角)を、カナマイシン $50\mu\text{g/m}$ を含むYEB液体培地で30℃にて1晩培養したアグロバクテリウム菌培養液に2分間浸し、滅菌したろ紙で余分な水気を除いた後、MS-NB培地上に置いた。12時間明所、8時間暗所の条件下で25℃にて5日間共存培養後、切片をMS液体培地で洗浄し、MS-NBC培地上に置いた。さらに5日間培養後、選択薬剤を含むMS-NBCK培地に切片を移し、約1カ月程度静置培養し、再生したシュートを葉部切片本体より切断して、MS-CK培地に植え継いだ。約1カ月後、発根した個体を土壌に植え替え自殖種子を得た。

【0023】

実施例3 (トランスジェニック植物における導入遺伝子の確認)

トランスジェニックタバコの種子を2.5%次亜塩素酸/0.002%Triton X-100に5分間浸し、次いで、滅菌水で4-5回洗浄後、カナマイシン $100\mu\text{g/ml}$ を含むMS培地で培養し無菌発芽させた。カナマイシン耐性を示した個体からCTAB法によりゲノムDNAを調製し、このDNA50ngを鋳型に、レポーター遺伝子であるGUS遺伝子の塩基配列の一部を有するオリゴヌクレオチド I と、配列番号1で示される塩基配列からなるDNAを含む本発明プロモーターの塩基配列の一部を有するオリゴヌクレオチド J、

オリゴヌクレオチド I ; 5'- ATCAA CACCT CAACA TTGAT GTTAG CGTAC -3' (30mer)

オリゴヌクレオチド J ; 5'- TCTGC ATCGG CGAAC TGATC -3' (20mer)

との組み合わせをプライマーに用いるか、またはレポーター遺伝子であるGUS遺伝子の塩基配列の一部を有するオリゴヌクレオチド K と、NOSターミネーターの塩基配列の一部を有するオリゴヌクレオチド L、

オリゴヌクレオチド K ; 5'- ACATG TGGAG TGAAG AGTAT C -3' (21mer)

オリゴヌクレオチド L ; 5'- GATAA TCATC GCAAG ACCGG -3' (20mer)

との組み合わせをプライマーに用いてそれぞれPCR反応を行い (94℃1分間、次いで55℃2分間、72℃3分間の保温を1サイクルとして40サイクル)、PCR産物の一部を0.8%アガロースゲル電気泳動で分画した。その結果、それぞれ目的とする約310bp、約400bpの長さのDNA断片の増幅を確認した。

【0024】

実施例4 (導入遺伝子の発現の確認)

実施例2で得られたトランスジェニック植物の実生の葉と根におけるGUS活性の測定とGUS染色をJefferson Plant Mol.Biol.Rep.5:387-405(1987)に記載の方法に準じて行った。GUS活性は、4-メチルウンベリフェリルグルクロン酸を基質とした蛍光法で測定し、活性染色は 5-ブromo-4-クロロ-3-インドリル-β-D-グルクロン酸 (X-Gluc) を基質として行い青色色素 (インジゴチン) の沈着量を測定した。

(1) GUS染色

上記トランスジェニックタバコの種子を、カナマイシン100 μg/mlを含むMS培地で培養して無菌発芽させ、1週間後、3週間後、1カ月後に、カナマイシン耐性の植物体を引き抜き、GUS染色液 (1 mM X-Gluc、0.5 mM K₃Fe(CN)₆、0.5 mM Fe₄Fe(CN)₆、0.3% Triton X-100) に浸して37℃で1晩反応させた。反応後、100%エタノールを用いて脱色し、その染色パターンを観察した。その結果、本発明プロモーターを有するTiプラスミド発現ベクター pBICR16G6Pを導入したトランスジェニックタバコにおいて、該発現プラスミド上で本発明プロモーターの下流に接続されているβ-グルクロナーゼ遺伝子が葉部、根部、茎部で高発現していることが確認された。

【0025】

(2) GUS活性測定

上記トランスジェニックタバコ種子をカナマイシン $100\mu\text{g/ml}$ を含む培地で培養して無菌発芽させ、 25°C で培養した。播種後1週間、3週間、1ヶ月後に、カナマイシン耐性の植物体の根部 0.8g 、葉部 0.5g を採取して乳鉢にとり、それぞれ 1ml 、 0.5ml の抽出バッファー（ 50mM リン酸緩衝液 $\text{pH}7.0$ 、 10mM EDTA、 0.1% Triton X-100、 0.1% Sarcosyl、 10mM メルカプトエタノール）を添加し、海砂を適量加え摩砕した。この摩砕液をエッペンドルフチューブに移して遠心分離し、上清を分取した。この液 $10\sim 70\mu\text{l}$ を $500\mu\text{l}$ の反応基質液（ 50mM リン酸緩衝液 $\text{pH}7.0$ 、 10mM EDTA、 0.1% Triton X-100、 0.1% Sarcosyl、 10mM メルカプトエタノール、 1mM 4-methylumbellifer- β -D-glucuronide）に添加し、 37°C で保温した。一定時間おきに反応液 $100\mu\text{l}$ をサンプリングし、直ちに $900\mu\text{l}$ の反応停止液（ 0.2M 炭酸ナトリウム溶液）を添加して混合した。このように調製したサンプルの蛍光を分光蛍光光度計（日立製作所 F-2000）で測定した（励起光波長 365nm 、発光波長 455nm ）。この測定値と葉部、根部の抽出液のタンパク質濃度の値からGUS活性を算出した。結果を表1に示す。尚、タンパク質濃度の定量はBIO-RAD社のProtein assay reagentを用いた方法で行った。本発明プロモーター有するTiプラスミド発現ベクターpBICR16G6P（本発明プロモーターと β -グルクロニダーゼ遺伝子とが連結されてなるDNAを有する）を導入したトランスジェニックタバコの葉部、根部の試料からGUS活性が検出され、最も高い個体ではpIG121HMベクター（35Sプロモーターと β -グルクロニダーゼ遺伝子とが連結されてなるDNAを有する）を導入した個体の8倍高い活性を示した。

【0026】

【表1】

トランスジェニックタバコのGUS活性測定の結果

（本発明プロモーター有するTiプラスミド発現ベクターpBICR16G6Pを導入したタバコ個体がIP-8～14、pIG121HMベクターを導入したタバコ個体がPIG-1～2である。相対比は、各生育段階における葉部、根部でのGUS活性値を、pIG121HMベクター導入タバコ（PIG-2）の該活性値を1として表した値である。）

播種後1週間

タバコ個体	GUS 活性 (pmol-MU/min/mg-protein)			
	葉部 (X10 ⁴)	相対比	根部 (X10 ⁴)	相対比
本発明(IP-8)	1.40	1.9	1.70	1.4
本発明(IP-9)	1.10	1.5	1.10	0.9
本発明(IP-10)	1.00	1.4	1.40	1.2
本発明(IP-11)	1.20	1.6	1.30	1.1
本発明(IP-12)	1.60	2.2	2.40	2.0
本発明(IP-13)	1.70	2.3	1.70	1.4
本発明(IP-14)	0.64	0.9	0.68	0.6
比較例(PIG-1)	0.71	1.0	1.00	0.8
比較例(PIG-2)	0.74	1.0	1.20	1.0
遺伝子非導入株 SR1	0.00	0.0	0.00	0.0

【0027】

播種後3週間

タバコ個体	GUS 活性 (pmol-MU/min/mg-protein)			
	葉部 (X10 ⁴)	相対比	根部 (X10 ⁴)	相対比
本発明(IP-8)	1.90	2.7	3.60	1.6
本発明(IP-9)	1.20	1.7	2.30	1.0
本発明(IP-10)	2.20	3.1	5.00	2.3
本発明(IP-11)	1.40	2.0	3.00	1.4
本発明(IP-12)	2.80	3.9	6.00	2.7
本発明(IP-13)	1.40	2.0	4.30	2.0
本発明(IP-14)	1.80	2.5	6.80	3.1
比較例(PIG-1)	1.00	1.4	1.90	0.9
比較例(PIG-2)	0.71	1.0	2.20	1.0
遺伝子非導入株 SR1	0.00	0.0	0.00	0.0

【0028】

播種後1ヶ月

タバコ個体	GUS 活性 (pmol-MU/min/mg-protein)			
	葉部 (X10 ⁴)	相対比	根部 (X10 ⁴)	相対比
本発明(IP-8)	1.50	2.9	2.60	2.6
本発明(IP-9)	1.00	2.0	1.00	1.0
本発明(IP-10)	1.10	2.2	2.80	2.8
本発明(IP-11)	0.90	1.8	1.40	1.4
本発明(IP-12)	3.40	6.7	8.40	8.4
本発明(IP-13)	1.50	2.9	3.60	3.6
本発明(IP-14)	1.20	2.4	2.50	2.5
比較例(PIG-1)	0.09	0.2	0.88	0.9
比較例(PIG-2)	0.51	1.0	1.00	1.0
遺伝子非導入株 SR1	0.00	0.0	0.00	0.0

【0029】

実施例において用いられた培地の組成を以下に示す。

(1) タバコ用培地

①MS 寒天培地

MURASHIGE AND SKOOG BASAL MEDIUM(SIGMA社製)4.4g、ショ糖30gを蒸留水 1 L に溶かし、1M KOH で pH 5.8 に調製し、アガー（和光純薬）を8g 添加した後、オートクレーブ滅菌した。

②MS-NB寒天培地

MS寒天培地に、1-ナフタリン酢酸 (NAA) 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 、6-ベンジルアミノプリン (BA) 1.0 $\mu\text{g/ml}$ を添加した培地である。

③MS-NBC寒天培地

MS-NB寒天培地に、クラフオラン300 $\mu\text{g/ml}$ を添加した培地である。

④MS-NBCK寒天培地

MS-NB寒天培地に、カナマイシン100 $\mu\text{g/ml}$ 、クラフオラン300 $\mu\text{g/ml}$ を添加した培地である。

⑤MS-CK寒天培地

MS寒天培地にカナマイシン $100\mu\text{g/ml}$ 、クラフォラン $300\mu\text{g/ml}$ を添加した培地である。

(2) 細菌、ファージ用培地

①L-培地

バクトトリプトン (Difco社製) 10g、バクトイーストエキストラクト (Difco社製) 5g、NaCl 10gを蒸留水 1 L に溶かし、5M NaOH で pH 7.0 に調製し、オートクレーブ滅菌する。プレートの場合はこれに15gの寒天を添加する。

②YEB培地

バクトビーフエキストラクト (Difco社製) 5g、バクトイーストエキストラクト (Difco社製) 1g、ポリペプトン5g、シヨ糖5g、10M NaOH 0.2mlを 蒸留水 1 L に溶かし、オートクレーブ滅菌する。オートクレーブ後、フィルター滅菌した1 M MgSO_4 を0.2ml添加して用いる。寒天培地を調製する場合はこれに15gの寒天を添加する。

【0030】

【発明の効果】

本発明により、遺伝子を植物で効率よく発現させることの可能なプロモーターおよびターミネーターが提供可能になった。

【配列表】

<110> Sumitomo Chemical Co. Ltd.

<120> Plant promoter and terminator

<130> P149669

<160> 2

<210> 1

<211> 2052

<212> DNA

<213> *Daucus carota* L.

<220>

<221> promoter

<222> (1)...(2052)

<400> 1

catgtgtgcc ctacagcaca tagggcctgt ttggttgaga gaagcagaag ctgcttctga	60
cttcttcttc ttttgacctg tttgtataaa gaagtagaaa tatttttaaa aagctgcgaa	120
tactaacttc tctctcaca cttccgcttc ttttccaaac actttattaa cttttttact	180
tctcatttct actccacttc ttgctataa gcaagaaatc acttctttta agctaacca	240
aacggcctca ataaaagatc attcataaat gtatctttca attttaggat aacaatacgt	300
gaacagggtt attttttaac gtgtcaacaa attctaataa ttttacctgg ccggtgaaca	360
ccgtcttcca agataatata ttttaatttt gtagcctccc ttttaaccaa attcgcgtgc	420
aggacgactt aggtgaatac acattgtact gtgagtcttt aaacaaagaa caagtgggtc	480
atgctcagcc atcaaaattg acaaaacccg acacaacact ctatccacgt actatacttt	540
tggccgaatg cttctcaaaa tgttttttat atgtaaaata atgcccattc aaggataagt	600
aaaattcccc ttttaaccagt ttgttaatat atatgtttac acttacaaga ggatattcgt	660
aatactttta gacgacaaga gacttaggtc aaaaatggac gctggtaaag agcctagact	720
tggtcactga taaatagata attgttagta taatatagta ggatctacaa tgacattaaa	780
attagagcta ttaattaagt tactaataaa taagagaggt tagtaaacag aaagcaggta	840
aaaacaagag cttgctgctg tgtgtttagt tgttgtgagc tcatttcttt aaaagtaatg	900
taaactgata taaagcacat agaaatttag tacaggttaa aacttttaca agaatttata	960
ttaaacgaaa atcattttat aacatgtctc tcggctgtca ttataatagg gatcacttac	1020
tgatcatcca ttaaaacctt gttaaaacaa attcaatgag ataaaatata ttacaatgaa	1080
aagaaggaca atgtctcttt gaaaaaacia ataggtactc cctccgtccc tctgaaatgt	1140
atacatatgg attggacacg gagactaaga aaaatgtata aagtaatgta gagtaaaaag	1200
aaagagaaag aaaagtgggt aaagtagcgg gaccaccaa tatataattg atagatttag	1260

aaaagtagtt gaaagtagtg ggtgggtggg atttttatat tataaaaatt tactattttg 1320
 agaaaagtttt gaaatgtata gaattgagtg ggacatccat aaaaggaaag tgtatagaat 1380
 taaatgggac agaggagta atacctttat gatataataa tttttgttat ttgatttca 1440
 taagattata aatctatgtt ataatgataa tataatttta aaaataatac tatattaatt 1500
 ctgattagtc gattaccgcc ttttataatt ttacaatact gagtaatatg aataaatcag 1560
 ttatctgaaa agcaaataat atctttgtta aacagcgttc ggtcaaatgg gaagttcatg 1620
 tgtattcaat agttttaata taaaagtaaa ttttaaatta attgttattt ttgtttcaga 1680
 aatttaaaat aaattattga gcatgggaag ttacacgggca tcattgagca gcactagact 1740
 gtttgaacaa tgtatgtccg gtgtacatct atgaccttc aactcaaact agtgaataat 1800
 gcattctaga atacatcttt tcaaatttca acaaacacag cttaacttt tctttcaacg 1860
 gattggaatc cttttctaaa ctttttaaaa taaaaaaaat gcattattgt aatatttatc 1920
 aacacctcaa cattgatgtt agcgtactat aaatagggtc tcttggtgct ctactatcat 1980
 cacatcaatc ttacaccaca aaccttgagc ttaatttttc tacttattct cagcaataac 2040
 attctaaata tc 2052

<210> 2

<211> 851

<212> DNA

<213> *Daucus carota* L.

<220>

<221> terminator

<222> (1)...(851)

<400> 2

ctgaaaagga agttcatcga tctatcagca aaattagaga acttgtgagg tcacagaagt 60
 ctgaaggact agcggaaacct gaaactgggt ctgagaagag gatcacctac gagcaagtga 120
 agaaaatggc aactttattt gatgacttgt tgatatttat tgagaattac aactttgcag 180
 aaaagccaac tctgcggttt caggttctgg aattaattaa gctttttacat cactatggaa 240

```

gtgatactat tcgaagcgga gtggaggaag aacttgagta cgtgaatgag aaaaattcag 300
caacacagta caagaaagct ctggaagtaa tgttgagagt atgcaataag gagaatacgg 360
ggatacgtca aagtattttt tacgacacaa tagaaaaggc agaaagggat aaagtgtctt 420
atgaatggtg aggaattggg acggtttagg ttagcttaaa aaaagtgact tcttacttga 480
agtaatgaag tggagtagaa ctgataagta aagtaataat tataagttat taaagtgttt 540
ggaaaagaaa tagaagttgt aaagaaaagt tagcattttc tacttccaac ttatttctca 600
cgacttctta aaagtacttc ttactttttt acacaaacgg gtcaaggaaa gtggaagcaa 660
aaagctggag ttacttctta taagaatgtt tatactaaat gagaaatgac aaacacagaa 720
atgagaatga atatgattat tggtttaata atagtgtatt ttatttaaaa agatcgcata 780
cattaccagc cagatgaagt tattcatcac aactcacaac aaagtacaaa gaaaaagttg 840
caattctgtc a 851

```

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、本発明プロモーターを含有するプラスミドpCR16G6Pの制限酵素地図を示す図である。Promoterは本発明プロモーターを示す。また、Ampはアンピシリン耐性遺伝子、lacIはラクトースオペロンのリプレッサータンパク質遺伝子、lacZはβ-ガラクトシダーゼ遺伝子、ORIは複製開始点を表す。

【図2】

図2は、本発明ターミネーターを含有するプラスミドpCR16G6Tの制限酵素地図を示す図である。Terminatorは本発明ターミネーターを示す。また、Ampはアンピシリン耐性遺伝子、lacIはラクトースオペロンのリプレッサータンパク質遺伝子、lacZはβ-ガラクトシダーゼ遺伝子、ORIは複製開始点を表す。

【図3】

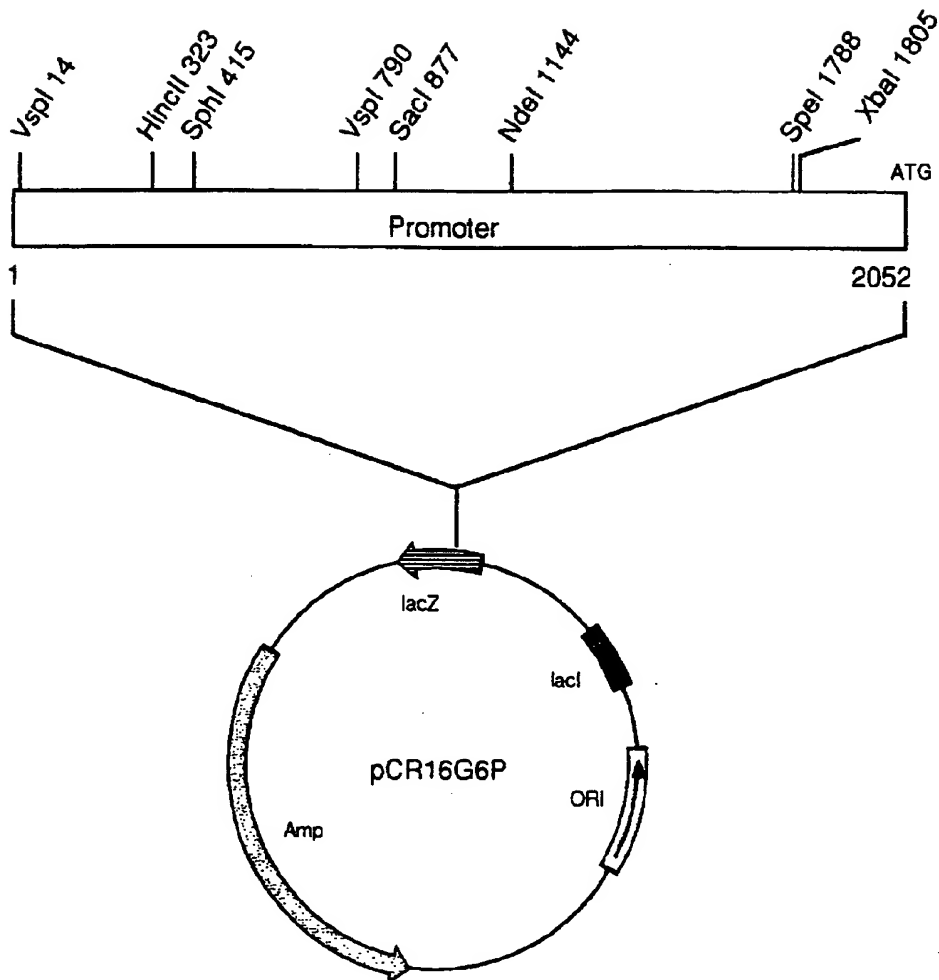
図3は、本発明プロモーターを挿入した発現ベクターpBICR16G6Pの制限酵素地図およびその構築過程を示す図である。G6-pは本発明プロモーターを示す。nos-pはノパリン合成酵素遺伝子のプロモーター、nos-tはノパリン合成酵素遺伝子のターミネーター、35S-pはカリフラワーモザイクウィルスの35Sプロモーターを意味する。また、NPTIIはカナマイシン耐性遺伝子、GUSはβ-グルクロニダーゼ遺

伝子、HPTはハイグロマイシン耐性遺伝子を表す。

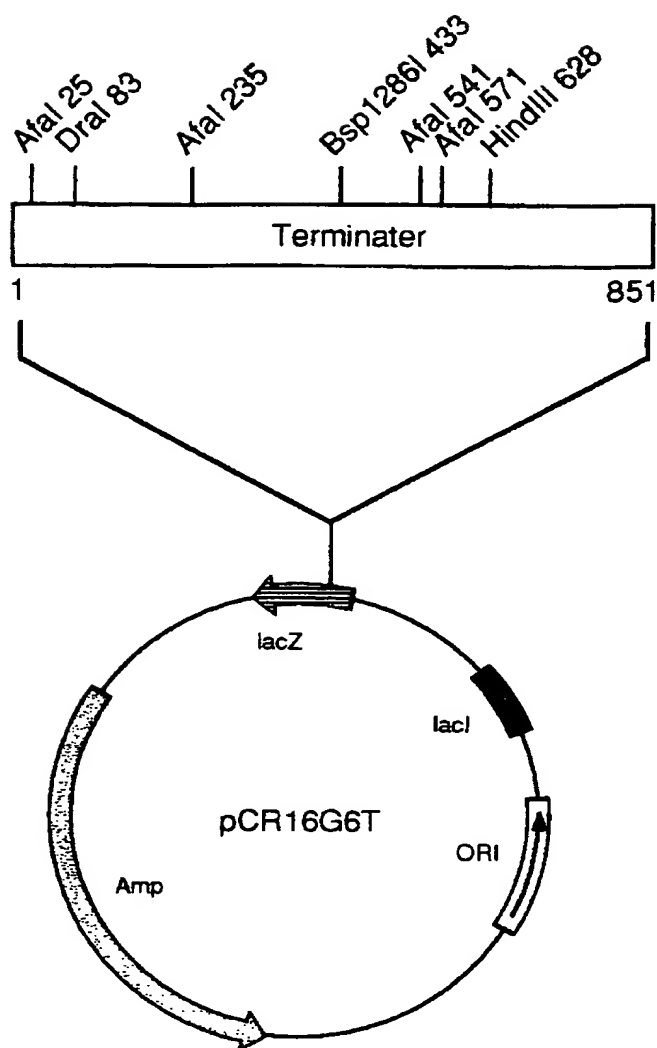
【書類名】

図面

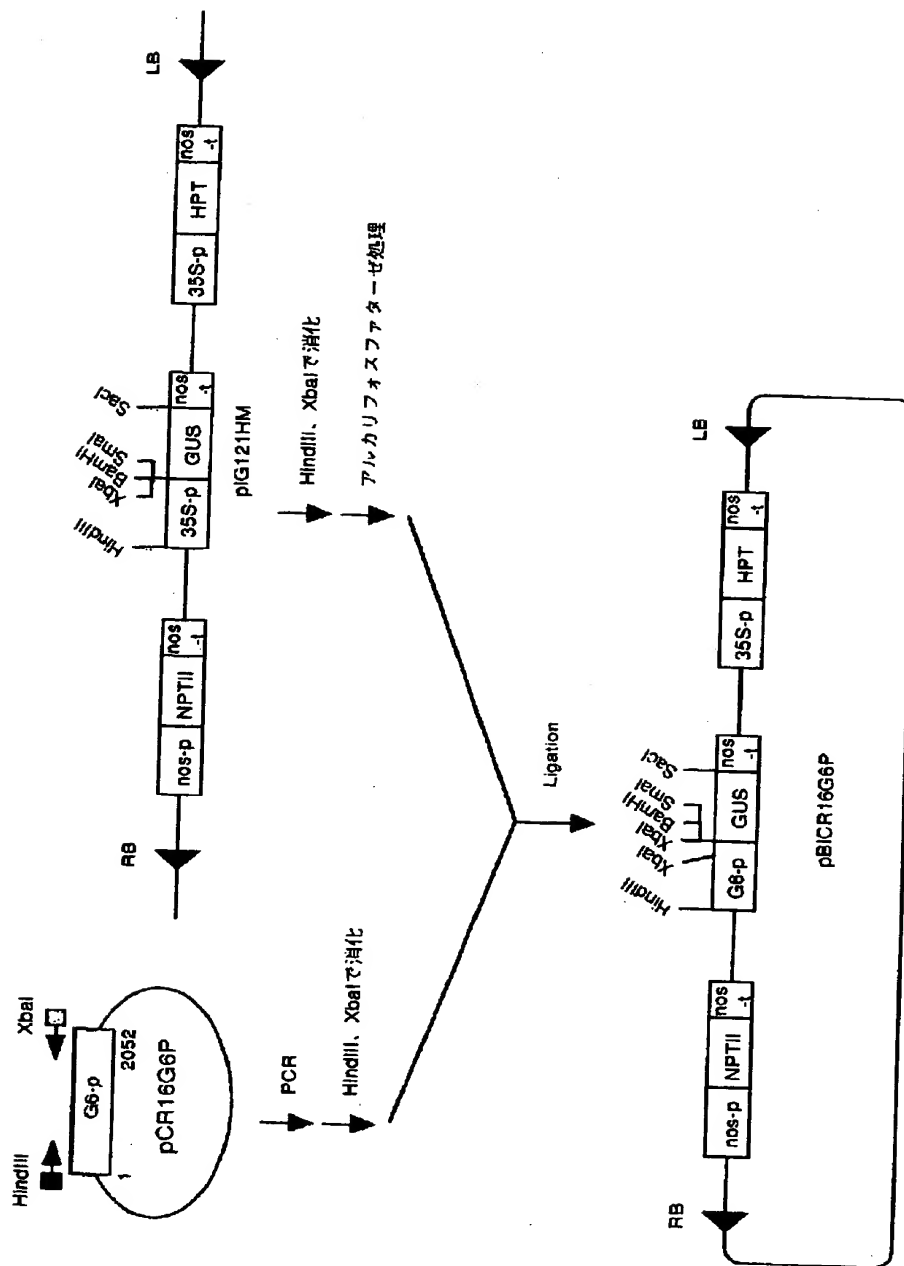
【図 1】



【図 2】



【図3】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】

遺伝子を植物で効率よく発現させることの可能なプロモーターおよびターミネーターを提供すること。

【解決手段】

以下の (a) または (b) の DNA を含む植物プロモーター。

(a) 配列番号1で示される塩基配列からなる DNA

(b) 配列番号1で示される塩基配列において1もしくは複数の塩基が欠失、置換もしくは付加された塩基配列からなり、かつ、植物細胞においてプロモーター機能を有する DNA

【選択図】 なし

【書類名】 職権訂正データ
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】 000002093

【住所又は居所】 大阪府大阪市中央区北浜4丁目5番33号

【氏名又は名称】 住友化学工業株式会社

【代理人】 申請人

【識別番号】 100093285

【住所又は居所】 大阪府大阪市中央区北浜4丁目5番33号 住友化学工業株式会社内

【氏名又は名称】 久保山 隆

【選任した代理人】

【識別番号】 100094477

【住所又は居所】 大阪府大阪市中央区北浜4丁目5番33号 住友化学工業株式会社内

【氏名又は名称】 神野 直美

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000002093]

1. 変更年月日 1990年 8月28日

[変更理由] 新規登録

住 所 大阪府大阪市中央区北浜4丁目5番33号
氏 名 住友化学工業株式会社

THIS PAGE BLANK (USPTO)